

Metodika využití DNA markerů pro systém kontroly deklarovaného původu reprodukčního materiálu smrku ztepilého

Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.

Strnady 136, Jiloviště 252 02

<http://www.vulhm.cz>

Pavλίna Máchová, Helena Cvrčková, Olga Trčková, Josef Cafourek, Ladislav Šimerda

Adresa autorů:

Ing. Pavλίna Máchová, Ph.D.¹, Ing. Helena Cvrčková, Ph.D.¹, Ing. Olga Trčková¹, Ing. Josef Cafourek¹, Ph.D.,
Ing. Ladislav Šimerda, Ph.D.²

¹Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i.

Strnady 136, Jiloviště 252 02

²Lesy Colloredo-Mansfeld s.r.o.

Email: machova@vulhm.cz, cvrcokova@vulhm.cz, trckova@vulhm.cz, Josef.Cafourek@seznam.cz,
simerda@colloredo.opocno.cz

Obsah:

- I. Cíl metodiky**
- II. Vlastní popis metodiky**
 - 1. Úvod
 - 2. Metodické postupy
 - a. Odběr vzorků a postupy izolace DNA*
 - b. Postupy PCR amplifikace*
 - c. Postupy elektroforézy v agarózovém gelu*
 - d. Postupy fragmentační analýzy a hodnocení PCR produktů*
 - e. Zpracování molekulárních dat*
- III. Srovnání novosti postupů**
- IV. Popis uplatnění metodiky**
- V. Ekonomické aspekty**
- VI. Dedikace**
- VII. Seznam použité související literatury**
- VIII. Seznam publikací, které předcházely metodice**
- Summary**

Abstract

The aim of this methodology is to present the possibilities of using objective methods of DNA analysis to verify the declared origin of reproductive material of Norway spruce in terms of the Czech Republic. The methodology describes the processes of sampling, isolation of DNA, conditions of the polymerase chain reaction (PCR), separation and sizing of amplification products, and molecular data calculations. The methodological procedures are based on a study of monitoring of reproductive material identity, which was realized during three years, i.e. from the seed collection to transplanted plants production. Analyses of microsatellite markers were performed on 1920 samples of the 32 sets of reproductive material from 8 selected sources of forest reproductive material (units of forest reproductive material) and the genetic compositions of sets were compared after statistical processing. Seven optimally polymorphic markers with sufficient informative value were selected for the subsequent evaluation of the genetic structure of the monitored sets of Norway spruce reproductive material by Bayesian clustering. Using the performed Structure analysis, the obtained profiles of 8 monitored units of reproductive material (4 sample sets from one units) of different origin were distinguishable from each other. These methodological procedures could be used in the state control systems of verifying declared origin of Norway spruce forest reproductive material and to increase consumer protection of forest owners and nursery producers in the Czech Republic.

Keywords: Norway spruce; control systems of forest reproductive material origin, microsatellites

Použité zkratky v textu:

DNA – deoxyribonukleová kyselina

nSSR - nuclear Simple Sequence Repeats (jaderné mikrosatelity)

SSR - Simple Sequence Repeats (mikrosatelity)

PCR – Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)

Oponenti: Ing. Vlasta Knorová, DiS., Ministerstvo zemědělství ČR, odbor hospodářské úpravy a ochrany lesů
RNDr. Slavomír Rakouský, CSc., odborný konzultant, České Budějovice

I. Cíl metodiky

Cílem práce bylo zpracovat metodické postupy analýz DNA s využitím vybraných mikrosatelitových markerů pro možnost ověření genetické struktury a sledování identity oddílů reprodukčního materiálu (RM) smrku ztepilého v různých fázích zpracování, od sběru semenného materiálu až po dopěstování sadebního materiálu. Získané postupy lze následně využít v kontrolních systémech státní správy a pro zvýšení spotřebitelské ochrany vlastníků lesa a producentů sazenic.

II. Vlastní popis metodiky

1. Úvod

Umělá obnova lesa zůstává v rámci České republiky převažujícím způsobem obnovy lesa. Na rozdíl od zemědělství se v lesním hospodářství pracuje většinou s původními druhy (a částečně dosud i populacemi) lesních dřevin a jednou z hlavních podmínek úspěšné umělé obnovy lesa je použití sadebního materiálu vhodného původu. Zajištění této podmínky je spojené s potřebou evidovat horizontální i vertikální přenosy reprodukčního materiálu (RM) lesních dřevin, s cílem udržet vysokou a kvalitní hospodářskou produkci a zajistit ochranu přirozeného genofondu domácích populací. V lesním hospodářství ČR dochází každoročně k pohybu značného množství RM lesních dřevin a i z tohoto důvodu je nutné, aby oprávněné státní orgány měly k dispozici účinné metody, kterými lze podpořit či vyloučit deklarovaný původ. Velká část sadebního materiálu pěstovaného v lesních školkách pochází z osiva z lesních porostů, což jsou zpravidla přirozené populace s vysokou genetickou diverzitou (kdy navíc je genetická struktura konkrétního oddílu osiva podle roku sběru jiná), a to je i důvodem, proč je současný evropský systém garance původu RM lesních dřevin postaven na principu pravidelných úředních kontrol v kombinaci s povinností vedení evidencí. Vývoj biochemických a molekulárních metod využívaných i u lesních dřevin otevřel v této složité problematice kontroly identity lesního RM nové možnosti.

Genetickou skladbu organismů a jejich variabilitu na úrovni populací a jedinců lze stanovit pomocí DNA markerů (např. mikrosatelitové markery), které jsou založeny na polymorfismu nukleotidových sekvencí a na rozdíl od izoenzymových markerů nereagují na environmentální změny. Mikrosatelitové markery (SSR markery) jsou využívány pro ověřování deklarované klonové identity zdrojů reprodukčního materiálu smrku ztepilého například v semenných sadech, klonových archivech (MÁCHOVÁ et al. 2014, CVRČKOVÁ et al. 2018), a dále pro studium

genetické struktury a diverzity smrkových porostů (SCOTTI et al. 2000, 2002, 2006; RUNGIS et al. 2004; MELONI et al. 2007; TOLLEFSRUD et al. 2009; FLUCH et al. 2011; UNGER et al. 2011; NOWAKOWSKA et al. 2014; CVJETKOVIĆ et al. 2017; VERBYLAITÈ et al. 2017).

Využití biochemických markerů pro možnost kontroly identity RM lesních dřevin v průběhu procesu získávání sadebního materiálu je základem zavedeného systému ZüF-Verfahren (BEHM, KONNERT 2002; KONNERT, BEHM 2006) využívaného v Německu. Tento systém je založen na získávání a uchovávání referenčních vzorků, které umožňuje průběžné i následné porovnávání oddílů RM a dále na výběru vhodných molekulárních metod a markerů. Uvedený systém byl zpočátku nastaven na využívání izoenzymových markerů, tyto byly později nahrazeny markery s vyšší rozlišovací schopností (nEST - PCR markery, SSR markery). Pro možnost kontroly identity oddílů RM jsou vhodné markery vykazující spíše střední genetickou variabilitu, zároveň ale jsou dostatečně variabilní na úrovni sledovaných souborů (KONNERT, BEHM 2006).

Účelem zpracovávaných metodických postupů bylo pro možnost ověřování podobnosti genetické struktury vybraných oddílů RM smrku ztepilého vybrat vhodné jaderné mikrosatelity, nuclear simple sequence repeats (nSSR) markery s dostačující genetickou variabilitou, ověřit vhodný počet odebíraných vzorků pro postup odběrů referenčních vzorků při procesu provozního nakládání s RM a zpracovat vhodné postupy vyhodnocení genetických analýz. Získané metodické postupy kontroly identity RM smrku ztepilého pomocí aplikace molekulárních metod lze následně využít v kontrolních systémech státní správy a pro zvýšení spotřebitelské ochrany vlastníků lesa a producentů sazenic.

2. Metodický postup

Nastavení metodického postupu sledování identity RM pomocí DNA analýz vycházelo z poloprovozní modelové studie, ve které byly analýzy vybraných SSR markerů provedeny u 1920 vzorků rostlinného materiálu z 8 zdrojů reprodukčního materiálu (uznaných jednotek, UJ) smrku ztepilého. Odběry referenčních vzorků z oddílů (UJ) byly realizovány v průběhu 3 let. Sběry semenného materiálu probíhaly z 35 – 60 stromů z uznaných porostů. V průběhu zpracování semenné suroviny bylo odebráno a analyzováno 60 vzorků semen ze šišek před zpracováním a 60 vzorků z osiva po vyluštění, při následné produkci sadebního materiálu v poloprovozních podmínkách bylo odebráno a analyzováno 60 vzorků z produkce semenáčku a 60 vzorků ze školkovaných sazenic. Odběry vzorků byly provedeny metodou náhodného výběru a tak aby v sebraných souborech vzorků

byly zahrnuty reprezentativně vzorky z celé sledované UJ. Přehled oddílů reprodukčního materiálu a označení jednotlivých analyzovaných souborů vzorků je uveden v příloze (Tab. 2.)

a. Odběr vzorků a postupy izolace DNA

Pro sledování identity RM je velmi důležité získat vzorky DNA ve vysoké kvalitě. Odběry je proto nutné provádět z rostlinného materiálu narostlého v daném roce, v případě smrku ztepilého jsou to mladé jehlice ze semenáčků a rozpracovaného sadebního materiálu, v případě analýz u osiva, lze k izolaci DNA využít embrya. Starší jehlice lze také použít, ale z důvodu vyššího obsahu fenolických látek a polysacharidů se snižuje kvalita i kvantita izolované DNA, což může zkomplikovat průběh navazující PCR pro získání jednoznačných a reprodukovatelných amplifikovaných lokusů. Při zpracování většího počtu vzorků je lépe odebírat mladé jehlice, zpracování pupenů je časově náročnější. Při manipulaci se vzorky je nutná evidenční kontrola, aby nedošlo k záměně mezi vzorky. Vzorky se tedy při odběru označí, ukládají se do mikroténového sáčku a udržují se při nízké teplotě (chladové tašky s namraženými destičkami) a co nejrychleji se přepraví ke zpracování v laboratoři. Vzhledem k následným analýzám je důležité vzorky držet stále při nízké teplotě. DNA lze izolovat okamžitě z takto čerstvě odebraných vzorků rostlinného materiálu. V případě, že izolace DNA není provedena ihned po přijmutí vzorků, je nutné vzorky po převedení do laboratorního režimu (zaevidování, nastříhání na vhodnou velikost apod.) uložit minimálně do $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Další možností jak uchovat vzorky je jejich vysušení za pomoci lyofilizátoru a poté je vzduchotěsně uzavřít v nádobách (lze použít plastové falkonky, scintilační lahvičky s dobře těsnícím uzávěrem). Takto zpracovaný (lyofilizovaný) materiál je snadněji zpracovatelný při následném tření vzorků, odpadá nutnost držet homogenizované vzorky na ledu. Pro izolaci DNA u lesních dřevin se nejlépe osvědčila metoda využívající soupravu DNeasy Plant Mini Kit od firmy QIAGEN dle dodaného protokolu (Quick-Start Protocol). Před zahájením vlastního postupu izolace se přidá ethanol ke koncentrátům pufrů AW1 a AW2. Inkubační lázeň se nechá nahřívat na $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. V případě výskytu sraženin v pufrách AP1 a AW1 se roztoky nahřejí pro odstranění těchto sraženin.

Protokol izolace DNA z rostlinných pletiv s použitím Dneasy Plant Mini Kitu:

1. Maximální množství výchozího čerstvého rostlinného pletiva je 100 mg, v případě lyofilizovaného pletiva 20 mg, rostlinné pletivo je potřeba rozdrtit na prášek, například za použití tekutého dusíku aplikovaného na navážený rostlinný materiál v třecích miskách. Utřený materiál se přenese se do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.

2. K rozdrčenému vzorku se napipetuje 400 μ l pufru AP1 a následně 4 μ l RnázyA, pomocí vortexu je nutné obsah důkladně protřepat. Získaná směs se nechá inkubovat 10 minut při 65 °C, během inkubace se musí směs promíchávat 2 – 3 \times převrácením zkumavek.
3. Přidá se 130 μ l pufru P3, krátce se promíchá pomocí vortexu a inkubuje 5 minut na ledu a poté centrifuguje 5 minut při rychlosti 14 000 rpm.
4. Vzniklý lyzát se přepipetuje do QIAshredder Mini Spin kolonky umístěné v 2ml zkumavce (collection tube) a centrifuguje 2 minuty při rychlosti 14 000 otáček za minutu (rpm).
5. Přefiltrovaná frakce se přepipetuje do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky s odečtením získaného objemu. Dáváme pozor, abychom nenabrali případný pelet.
6. Přidáme pufr AW1 v množství odpovídajícímu 1,5 násobku objemu odebrané frakce a ihned opakovaným nasáváním a vypouštěním z mikropipety vzniklou směs promícháme.
7. Odpipetujeme 650 μ l směsi a přemístíme do Dneasy Mini spin kolonky umístěné v 2ml zkumavce (collection tube) a centrifugujeme 1 minutu při 8 000 rpm, přefiltrovanou kapalinu odstraníme. Opakujeme tento krok se zbytkem vzorku.
8. Dneasy Mini spin kolonku umístíme do nové 2ml zkumavky, přidáme 500 μ l pufru AW2 a centrifugujeme 1 minutu při 8 000 rpm, přefiltrovanou kapalinu odstraníme.
9. Přidáme dalších 500 μ l pufru AW2 a centrifugujeme 2 minuty při rychlosti 14 000 rpm. Poté vyndáme opatrně Dneasy Mini spin kolonku ze zkumavky, abychom se nedotkli proteklé kapaliny.
10. Přeneseme Dneasy Mini spin kolonku do nové 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.
11. Přidáme 100 μ l AE pufru, který aplikujeme přímo na membránu Dneasy Mini spin kolonky. Necháme inkubovat 5 minut při pokojové teplotě a poté centrifugujeme 1 minutu při rychlosti 8 000 rpm.
12. Opakujeme krok dle bodu 11 pro získání druhého eluátu.

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

analytické váhy, digitální suchá lázeň, centrifuga, vortex, chladič blok na mikrozkušavky (- 20 °C LABTOP COOLERS), mrazicí box, sada pipet a příslušné (sterilní) špičky, sterilní mikrozkušavky Eppendorf 1,5 ml s víčky, sušička nebo sterilizátor

Kvalita extrahované DNA je podstatná pro získání požadovaných PCR amplifikátů. U vyzolované DNA lze zjistit její koncentraci v ng/ μ l a čistotu na základě poměru absorbancí při 260 nm a 280 nm spektrofotometrem na

mikroobjemy. Hodnoty pro optimální čistotu by se měly pohybovat v rozmezí 1,7 – 1,9, nižší nebo vyšší hodnoty indikují přítomnost dalších nežádoucích látek (např. proteinů, fenolických látek). Vzorky DNA s koncentrací nad 50 ng/μl je vhodné pro optimální průběh PCR amplifikace naředit AE pufrem na koncentraci 20 – 30 ng/μl.

b. Postupy PCR amplifikace

Pro DNA analýzy byla zvolena metoda nuclear simple sequence repeats (nSSR) – jaderné mikrosatelity. Z testovaných mikrosatelitových markerů bylo pro účely kontrolního systému vybráno 7 optimálně polymorfních jaderných mikrosatelitových lokusů PAAC23, (SCOTTI et al. 2000), SpAG₂ (MELNIKOVA et al. 2012), WS00716.F13, WS0022.B15, WS0073.H08, WS00111.K13 a WS0023.B03 (RUNGIS et al. 2004) viz Tab. 1. Vybrané mikrosatelitové markery mají charakter dvounukleotidových motivů a kromě markeru SpAG₂ byly odvozeny z kódující oblasti jaderného genomu (expressed sequence tags - simple sequence repeats). Pro získání amplifikačních produktů těchto lokusů byly optimalizovány reakční směsi a teplotní cykly polymerázové řetězové reakce (PCR) a vypracovány protokoly. Z důvodů časových i finančních úspor byly PCR amplifikace 7 vybraných mikrosatelitových lokusů sestaveny do dvou multiplexů. Reakční směsi je nutné připravovat na ledu nebo chladové destičce, DNA polymerázu připipetujeme do směsi jako poslední reakční složku a to způsobem, že ji vyjmeme přímo z mrazicího boxu jen na nutnou dobu aplikace.

Tab. 1: Vybrané mikrosatelitové lokusy a sekvence primerů

Lokusy	Sekvence primerů (5'-3')	Velikost PCR produktů (bp)
PAAC23	F: TGTGGCCCCACTTACTAATATCAG R: CGGGCATTGGTTTACAAGAGTTGC	266–312
SpAG ₂	F: GCTCTTCACGTGTACTTGATC R: TTCGAAGATCCTCCAAGATAC	83–121
WS00716.F13	F: TCAAGTAATGGACAAACGATACA R: TTTCCAATAGAATGGTGGATTT	204–250
WS0022.B15	F: TTTGTAGGTGCTGCAGAGATG R: TGGCTTTTTATTCCAGCAAGA	172–210

WS0073.H08	F: TGCTCTCTTATTCGGGCTTC R: AAGAACAAGGCTTCCCAATG	196–216
WS00111.K13	F: GACTGAAGATGCCGATATGC R: GGCCATATCATCTCAAAATAAAGAA	211–267
WS0023.B03	F: AGCAGCTGGGGTCAAAGTT R: AAAGAAAGCATGCATATGACTCAG	166–232

Protokoly PCR:

Multiplex 1 (SSR lokusy, koncentrace jejich primerů a příklad fluorescenčního označení forward

primerů):

PAAC23 F – 4 μ M (6FAM), PAAC23 R – 4 μ M

WS0022.B15 F – 4 μ M (NED), WS0022.B15 R – 4 μ M

WS00716.F13 F – 4 μ M (VIC), WS00716.F13 R – 4 μ M

Forward (F) i revers (R) primery naředíme na zásobní roztoky 100 μ M koncentrace (100 pmol/ μ l) pomocí TE pufru (1 mM Tris - HCl, pH 8.0, 0,01 mM EDTA). Připravíme směs z primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100 μ l, napipetujeme ze zásobního roztoku primerů PAAC23 F – 4 μ l, PAAC23 R – 4 μ l, WS0022.B15 F – 4 μ l, WS0022.B15 R – 4 μ l, WS00716.F13 F – 4 μ l, WS00716.F13 R – 4 μ l a doplníme 76 μ l TE pufru).

Příprava TE pufru (1 mM Tris - HCl, pH 8.0, 0,01 mM EDTA): 10 ml roztoku připravíme z 10 μ l 1M Tris - HCl a 0,2 μ l 0,5M EDTA, doplníme H₂O (molecular biology reagent) (Sigma – Aldrich) do 10 ml.

Optimalizovaný protokol v celkovém objemu 15 μ l na 1 vzorek s využitím Type-it® Microsatellite PCR Kit

(Qiagen, Hilden, Germany)

Reakční směs	Objem na 1 vzorek
H ₂ O RNase – free	5 μ l
Qiagen Multiplex	7,5 μ l

Primers Mix	1,5 μ l
Přidat 1 μ l templátové DNA	

Teplotní režim PCR

Krok	Teplota	Čas	Popis
1.	95 °C	15 min	Počáteční denaturace
26 x opakovat od 2. do 4. kroku			
2.	94 °C	30 sec	Denaturace
3.	53 °C	90 sec	Annealing
4.	72 °C	30 sec	Elongace
1x			
5.	60 °C	30 min	Finální elongace
6.	4 °C	Úložná teplota	Chlazení amplifikátů

Uvedené chemikálie kromě primerů jsou součástí komerčního kitu Type-it® Microsatellite PCR Kit

Multiplex 2 (SSR lokusy a koncentrace jejich primerů a příklad fluorescenčního označení forward primerů):

SpAG₂ F – 2 μ M (6FAM), SpAG₂ R – 2 μ M

WS0023.B03 F – 4 μ M (6FAM), WS0023.B03 R – 4 μ M

WS0073.H08 F – 4 μ M (NED), WS0073.H08 R – 4 μ M

WS00111.K13 F – 4 μ M (VIC), WS00111.K13 R – 4 μ M

Provedeme naředění primerů na zásobní roztoky 100 μ M koncentrace jako u multiplexu 1.

Připravíme směs z primerů v požadované koncentraci a v objemu dle počtu analyzovaných vzorků (např. pro objem 100 μ l, napipetujeme ze zásobního roztoku primerů SpAG₂ F – 2 μ l, SpAG₂ R – 2 μ l, WS0023.B03 F – 4

μl , WS0023.B03 R – 4 μl , WS0073.H08 F – 4 μl , WS0073.H08 R – 4 μl , WS00111.K13 F – 4 μl , WS00111.K13 R – 4 μl a doplníme 72 μl TE pufru).

Postup přípravy reakční směsi je stejný jako u multiplexu 1

Teplotní režim PCR

Krok	Teplota	Čas	Popis
1.	95 °C	15 min	Počáteční denaturace
26 x opakovat od 2. do 4. kroku			
2.	94 °C	30 sec	Denaturace
3.	55 °C	90 sec	Annealing
4.	72 °C	30 sec	Elongace
1x			
5.	60 °C	30 min	Finální elongace
6.	4 °C	Úložná teplota	Chlazení amplifikátů

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

vortex, sada pipet a příslušné (sterilní) špičky, mikrozkušavky (stripy, destičky PCR 0,2 ml s víčkem), box chladící na PCR mikrozkušavky, chladící destička, centrifuga, teplotní cyklovač

c. Postupy elektroforézy v agarózovém gelu

Předběžné hodnocení získaných amplifikačních produktů se provádí pomocí horizontální elektroforézy na 2% agarózových gelech. Agaróza (Agarose SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) se rozpouští zahříváním v 0,5 x TBE pufru (Tris borate EDTA pufr, Duchefa Biochemie B.V.) do získání čirého roztoku. K rozpouštění je vhodné použít mikrovlnnou troubu a proces rozpouštění je nutné sledovat, aby nedošlo k překypění roztoku. K

vizualizaci amplifikovaných fragmentů DNA se používá fluorescenční barvivo např. GelRed (GelRed™Nucleic acid Gel Stain, 10,000XinWater, Biotium, Hayward). GelRed lze přidat hned do rozpuštěného teplého agarózového roztoku v poměru 1:10 000 a po promíchání nalít do formy. Do tekutého gelu se ihned vloží hřebínky s vhodným počtem jamek dle počtu testovaných vzorků. Ztuhlý gel se opatrně přemístí do vany pro elektroforézu, vyjmou se hřebínky a přilije se 0,5 x TBE pufru tak, aby roztok přesahoval asi 0,5 cm nad gel. Do slotů gelu se nanáší PCR amplifikáty (15 µl) smíchané s 4 µl pufru (gel loading buffer, Sigma – Aldrich). Pro porovnání velikostí získaných amplifikátů se do vybraného slotu nanese směs: 1 µl standardu 100 bp DNA ladder (NEW ENGLAND Biolabs), 4 µl destilované vody a 2 µl pufru (gel loading buffer).

V elektrickém poli se pohybují záporné fragmenty DNA ke kladné elektrodě, jejich migrační schopnost závisí na jejich relativní hmotnosti (velikosti amplifikátu). Potřebná doba trvání elektroforézy je kolem 30 minut při napětí 60 V a dalších 120–150 minut při napětí 100 V. Po proběhlé elektroforéze se gely dokumentují pod UV zářením pomocí kamerového systému. DNA fragmenty se v gelovém nosiči projevují jako fluoreskující proužky.

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

analytické váhy, sada pipet a příslušné (sterilní) špičky, mikrovlnná trouba, vortex, horizontální elektroforéza se zdrojem, dokumentační systém s UV transluminátorem

d. Postupy fragmentační analýzy a hodnocení PCR produktů

Přesné zjištění velikostí amplifikovaných fragmentů v hodnotách párů bází se provádí na genetickém analyzátoru (např. typu Applied Biosystem 3500). Polymerázová řetězová reakce musí být provedena s fluorescenčně označenými primery (pro uvedený typ analyzátoru na 5'konci s modifikacemi 6FAM, VIC, NED, PET) a PCR amplifikáty musí být před fragmentační analýzou následujícím způsobem denaturovány na jednovláknové fragmenty. Nejprve se PCR produkty jednotlivých vzorků napipetují po 1 µl do 96jamkových destiček určených pro analyzátory a pak se ke každému vzorku přidá 11 µl směsi připravené z formamidu (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystem) a velikostního standardu (Gene Scan™ – 600 LIZ® Size standard v 2.0, Applied Biosystem). Směs se připravuje v objemech 11 µl formamidu a 0,4 µl velikostního standardu na jeden vzorek a pomocí vortexu se krátce promíchá. Po napipetování směsi k amplifikátům se destička krátce stočí na centrifuze, aby byl roztok u dna jamky, a pak se destička inkubuje 4 minuty při teplotě 94° C, následuje prudké zchlazení na ledu po dobu minimálně 2 minut.

Genetický analyzátor pracuje na principu elektroforetického rozdělení fragmentů DNA v tenké kapiláře naplněné speciálním polymerem. Polymer i zkoumaný vzorek je do kapiláry naplňován automaticky. Detekce fragmentovaných úseků je založena na hodnocení fluorescence z fluorescenčně označených primerů po excitaci laserovým zářením. Přístroj je schopen souběžně detekovat vícebarevnou fluorescenci, to umožňuje v multiplexovém uspořádání hodnotit najednou více markerů, což je z časových i finančních důvodů velmi výhodné. Pro jejich správnou identifikaci po proběhlé analýze je nutné jejich kombinaci sestavit z hlediska velikosti jejich alel a fluorescenčního zbarvení primerů.

Sedm vybraných lokusů lze seskupit pro fragmentační analýzu do 2 běhů. První běh se skládá z PCR produktů multiplexu 1 (amplifikované lokusy PAAC23, WS0022.B15, WS00716.F13) a druhý běh z PCR produktů multiplexu 2 (amplifikované lokusy SpAG₂, WS0023.B03, WS0073.H08, WS00111.K13).

Hodnocení velikosti amplifikačních produktů se provádí pomocí softwarového programu GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems), který z výsledku měření velikostního standardu, který je přidáván ke každému vzorku, stanoví kalibrační křivku a na jejím podkladě ohodnotí velikosti analyzovaných fragmentů.

Požadované přístrojové a materiálové vybavení:

sada pipet a příslušné špičky, vortex, teplotní cyklovač, centrifuga, genetický analyzátor

e. Zpracování molekulárních dat

Smrk ztepilý má diploidní sadu chromozomů. U sledovaného lokusu získáme pro každého jedince dvě shodné alely v případě homozygota nebo v případě heterozygota dvě různé hodnoty alel. Pro možnost srovnání genetických struktur oddílů RM se velikosti alel z hodnocených lokusů pro sledované soubory vzorků jednotlivých oddílů statisticky zpracovávají pomocí statistických programů GenAIEx 6.503 (PEAKALL, SMOUSE 2006, 2012) a STRUCTURE 2.3.4. (PRITCHARD et al. 2000; FALUSH et al. 2003, 2007; HUBISZ et al. 2009). Pomocí programu GenAlex 6.503 se získává ohodnocení genetických vzdáleností mezi populacemi, které lze vypočítat na základě Neiovy standardní genetické vzdálenosti (NEI 1972), grafické znázornění je umožněno pomocí analýzy hlavních koordinát (Principal Coordinate Analysis – PCoA). Čím bližší umístění souborů v grafickém vyjádření a v kvadrantu, tím jsou si srovnávané soubory geneticky bližší.

Pro možnost porovnání populační struktury sledovaných souborů vzorků s využitím multilokusových genetických dat se využívá Bayesiánská metoda implementovaná v softwaru STRUCTURE 2.3.4. U smrku ztepilého vzhledem k nízkým hodnotám F_{ST} (vzájemné diference mezi porosty) se v programu nastavuje model Lock prior. Optimální hodnota K (počet klastrů) se dále zjišťuje pomocí programu STRUCTURE HARVESTER (EARL, HOLDT 2012). Identita sledovaných souborů vzorků se dále zjišťuje porovnáním barevně odlišných proporcí jednotlivých klastrů získaných jako výsledek populační analýzy Structure (grafické vyjádření Bar plot). Pro možnost nastavení metodického postupu sledování identity RM v praxi bylo provedeno statistické porovnání genetické struktury u 4 souborů s různými počty vzorků (tedy soubory o velikosti 60 vzorků, 30 vzorků, 20 a 10 vzorků u jednotlivých sledovaných oddílů RM osmi uznaných jednotek). Výsledky zpracovaného statistického zhodnocení pro soubory různé velikosti ve formě grafického zpracování genetických vzdáleností analýzou hlavních koordinát PCoA a grafického zpracování výsledku populační analýzy (porovnání proporcí jednotlivých klastrů ve sledovaných souborech a zjištění jejich podobnosti) jsou uvedeny v příloze (Obr. 1 - 8). Z příložených hodnocení jsou nejvíce vypovídající výsledky (odlišené zdroje RM) získané analýzou 60 jedinců ve srovnávaných souborech, což je ve shodě s obecnými principy populační genetiky.

III. Srovnání novosti postupů

V souvislosti se vstupem ČR mezi členské země ES byla do národní legislativy transponována Směrnice Rady 1999/105/ES do zákona č. 149/2003 Sb. (ve znění pozdějších předpisů). Každá členská země ES je povinná vytvořit kontrolní systém k zajištění zachování pravdivé identity (informace o původu) daného oddílu RM od jeho získání až po dodávku konečnému spotřebiteli (MALÁ et al. 2013). V ČR je stávající systém kontroly odkázan na přísný dohled zaměřený na evidenci a kontrolu pohybu RM. K případům porušování ustanovení legislativních pravidel může docházet prakticky ve všech fázích procesu, počínajícího volbou zdroje pro sklizeň plodů nebo osiva, jeho využíváním pro sběr a dále ve všech fázích procesu počínaje sklizní až po výsev nebo výsadbu semenáčků či sazenic. V této souvislosti může docházet k porušování předpisů i ve vedení povinné evidence. Evidence nemusí být buď vedena vůbec, nebo je neúplná či dokonce nesprávná, a to buď z neznalosti předpisů, z nedbalosti, nebo v extrémním případě může dojít i k úmyslné falzifikaci (Šindelář 2000). V procesu nakládání s RM lesních dřevin v ČR byly v průběhu prováděných kontrol a dozoru pověřenou osobou ÚHÚL zjištěny nedostatky typu: nestandardně vystavená potvrzení o původu, chyby v předkládaných hlášení dodavatelů o reprodukčním materiálu v držení a uváděném do oběhu, nestandardní množství reprodukčního materiálu získaná

z uznaných jednotek, nepředložená hlášení dodavatelů, existence reprodukčního materiálu bez původu, množství vypěstovaných sazenic neodpovídající množství reprodukčního materiálu na potvrzení o původu apod. (KOTRLA, PAŘÍZEK 2008;). Nedostatkem používaného kontrolního systému je nemožnost dokázat případné porušení právních předpisů objektivní metodou, která by umožnila ověření skutečného původu vybraného vzorku RM lesních dřevin. Metody DNA analýz pro ověřování deklarovaného původu reprodukčního materiálu smrku ztepilého v průběhu sledování identity semenného materiálu od sběru osiva až po dopěstování sazenic jsou tedy vhodným doplňujícím nástrojem pro zavedený systém kontroly a dozoru nakládání s RM.

Novost postupů pro možnost ověření genetické struktury a sledování identity oddílů reprodukčního materiálu (RM) smrku ztepilého v různých fázích zpracování od sběru semenného materiálu až po dopěstování sadebního materiálu spočívala v ověření 7 optimálně polymorfních nSSR markerů (PAAC23, SpAG2, WS00111.K13, WS00716.F, WS0022.B15, WS0073.H08, WS0023.B03) a jejich ověření na souborech vzorků získaných v poloprovozních podmínkách. Jedná se o SSR markery vykazující střední genetickou variabilitu, ale projevující dostatečnou variabilitu na úrovni porovnávaných souborů RM. Amplifikace vybraných 7 lokusů byly sestaveny do dvou multiplexů a fragmentační analýzy na genetickém analyzátoru do dvou běhů.

Na základě provedených vyhodnocení souborů s různými počty jedinců (60, 30, 20, 10) v porovnávaných souborech, lze deklarovat, že počet jedinců umožňující potvrdit shodu v populační struktuře je 60, s tím, že orientační vypovídající výsledky lze dosáhnout i při snížení počtu analyzovaných jedinců ve srovnávaných souborech na 30. Stanovení minimálního počtu analyzovaných jedinců pro aplikaci postupů DNA analýz bylo realizováno s ohledem na ekonomickou proveditelnost případných prověření sporných případů identity RM pomocí DNA analýz.

IV. Popis uplatnění metodiky

Zpracované metodické postupy analýz DNA s využitím vybraných vhodně polymorfních mikrosatelitových markerů lze využít při ověřování genetické struktury a sledování identity oddílů reprodukčního materiálu (RM) smrku ztepilého v různých fázích procesu nakládání s RM, v období od sběru semenného materiálu až po dopěstování sadebního materiálu.

Zákon 149/2003 Sb. ve znění pozdějších předpisů (zákon o obchodu s reprodukčním materiálem lesních dřevin – RM) zavedl povinnost orgánů veřejné správy a pověřené osoby kontrolovat dodržování tohoto zákona, tato povinnost vychází ze Směrnice Rady 1999/105/ES. Každá členská země ES je povinna vytvořit kontrolní systém

k zajištění zachování pravdivé identity (informace o původu) daného oddílu RM od jeho získání až po dodávku konečnému spotřebiteli (MALÁ et al. 2013). V ČR je stávající systém kontroly odkázán na přísný dohled zaměřený na evidenci a kontrolu pohybu RM, pověřenou osobou pro provádění kontroly reprodukčního materiálu je v rámci České republiky ÚHÚL. Zpracované metody postupy DNA analýz uplatnitelné při ověřování deklarovaného původu reprodukčního materiálu smrku ztepilého v průběhu sledování identity semenného materiálu od sběru osiva až po dopěstování sazenic jsou vhodným doplňujícím nástrojem pro používaný systém kontroly procesu nakládání s RM, tyto postupy mohou být využity státní správou a pověřenou osobou ÚHÚL, Brandýs nad Labem při provádění kontrolní činnosti u reprodukčního materiálu lesních dřevin. Respektování ustanovení o získávání a pěstování reprodukčního materiálu lesních dřevin a nakládání s ním, tak jak je uvedeno v platných právních předpisech České republiky, je jednou z podmínek a předpokladů řádného hospodaření v lesích. Volba vhodného reprodukčního materiálu, evidence a jeho používání v souladu s platnými předpisy je základem hodnoty budoucích lesů (Šindelář 2000). Získané postupy lze využít pro zvýšení spotřebitelské ochrany vlastníků lesa a producentů sazenic.

Metodika popisuje postupy zpracování vzorků, izolace DNA, amplifikace vybraných lokusů, elektroforézy, fragmentační analýzy a zpracování molekulárních dat. Byly zvoleny mikrosatelitové markery s optimální mírou polymorfismu, které byly odzkoušeny v provedené poloprovozně založené studii u souborů vzorků rostlinného materiálu z 8 zdrojů reprodukčního materiálu (UJ) smrku ztepilého (Tab. 1, 2). V příloze jsou uvedeny i příklady grafických výstupů ukazující na podobnost genetických struktur šetřených souborů vzorků smrku ztepilého ze sledovaných UJ (Obr. 1 – 8). Možnosti uplatnění postupů DNA analýz v dalších laboratořích může komplikovat finanční náročnost přístrojového vybavení pro fragmentační analýzy, zejména genetického analyzátoru. Fragmentační analýzy si však lze objednat na zakázku u komerčních firem (např. SEQme, Genomac, BIOCEV).

V. Ekonomické aspekty

Významným ekonomickým aspektem uvedených metodických postupů vedoucích k možnostem objektivní kontroly procesu nakládání s reprodukčním materiálem lesních dřevin je přínos celospolečenský. Možnost důsledné kontroly realizace ustanovení obsažených v Zákoně 149/2003 Sb. ve znění pozdějších předpisů má zabezpečit, aby výsledkem obnovy a zalesňování byly hospodářsky hodnotné lesní porosty, stabilní, zdravotně vyhovující z hlediska produkce kvalitního dříví i se zřetelem na žádoucí ekologické a sociální funkce lesů. Současně dojde i k dalšímu naplňování požadavků Směrnice Rady 1999/105/ES. Vedle celospolečenských přínosů

se dá předpokládat i zvýšení tržeb z těžby dřeva u vlastníků lesů v podobě budoucích zvýšených výnosů smrkových porostů založených z kvalitního reprodukčního materiálu potvrzeného původu.

Smrk ztepilý je v našich podmínkách z hlediska jeho hospodářského uplatnění nejvíce rozšířený druh dřeviny, který zásadním způsobem ovlivňuje ekonomiku většiny lesních majetků všech forem vlastnictví, a tedy i celého lesního hospodářství a navazujícího dřevozpracujícího průmyslu (celého lesnicko-dřevařského sektoru).

Při reprodukci porostů z kvalitních genetických zdrojů je vyšší záruka, že bude v době mýtní zralosti lesních porostů dosaženo současně i vyšší objemové produkce. Při rozdílu porostních zásob vztažených k obmýtí u kvalitnějších smrkových porostů nacházejících se v současných genových základnách (GZ) oproti ostatním smrkovým porostům na území ČR v objemu 81,04 m³/ha a při průměrné ceně surového dříví za rok 2014 ve výši 1 180 Kč/m³ činí zvýšené tržby z prodeje dřeva u kvalitnějších smrkových porostů (v GZ) částku 95 627 Kč/ha.

Kalkulace byla provedena na základě těchto informačních zdrojů:

Analýza datového skladu ÚHÚL - DS ERMA (Pařízková, Hradec Králové, 2014)

Průměrná relativní bonita dřevin v ČR (Zpráva o stavu lesa a lesního hospodářství 1995, str. 96)

Černý, M., Pařez, J. - Malík, Z: Růstové a taxační tabulky hlavních dřevin České republiky (smrk, borovice, buk, dub), IFER, 1996

Vyhlášení průměrné ceny dřeva pro rok 2015 k výpočtu poplatku za odnětí lesních pozemků surového dříví (Věstník MZe, částka 2, str. 73, prosinec 2014)

Vzhledem ke skutečnosti, že průměrná cena surového dříví v ČR, která je každoročně zveřejňována ve Věstníku MZe, v roce 2014 činila 1 180 Kč/m³ a reprezentuje cenu dřeva na pni, tj. cenu surového dříví na odvozním místě po odečtení těžebních nákladů, je možné tento ekonomický efekt současně označit za zvýšený čistý výnos získaný ze smýceného lesního porostu v době obmýtí, který se projeví i ve zvýšeném hospodářském výsledku (zisku) vlastníků lesa.

Ve skutečnosti lze očekávat ekonomický přínos pro vlastníka lesa ještě vyšší, pokud porovnáme obě hodnoty mýtní výtěže v obmýtí (v GZ oproti ostatním smrkovým porostům) vypočtené na základě obvykle dosahovaného procentického podílu jednotlivých sortimentů surového dříví a jejich cen (především pilařských výřezů) a obvyklých těžebních nákladů v místě a čase.

Vyšší celková objemová produkce porostů z kvalitních genetických zdrojů se však neprojeví v ekonomice vlastníků lesa pouze v době obmýtí, ale již také v rámci výchovných opatření v podobě zvýšených příjmů

z provedených probírek (z předmýtních těžeb), což rovněž pozitivně ovlivní ekonomickou situaci vlastníků lesa a přispěje k podpoře ekonomického pilíře trvale udržitelného hospodaření v lese.

Vzhledem k současné kalamitní situaci u smrkových porostů je zhodnocení ekonomického přínosu vztaženo k období předcházejících hospodářských výsledků.

Náklady na postupy genetických analýz uvedených v metodice jsou kalkulovány na spotřební materiál a chemikálie s předpokladem vlastnictví laboratorního vybavení pro analýzy DNA. Na izolaci DNA vzorku z jedince jsou průměrné náklady 118,- Kč. Náklady u jedince na PCR produkty a následné fragmentační analýzy činí pro 7 lokusů přibližně 130,- Kč vč. DPH, za předpokladu provedení analýz v multiplexech dle uvedených optimalizovaných postupů. Náklady jsou kalkulovány k roku 2021 a je nutné zmínit, že cena chemikálií se postupně navyšuje. V uvedené kalkulaci našich nákladů (výzkumné pracoviště) nejsou zahrnuty doplňkové náklady, náklady na odpisy přístrojového vybavení, osobní náklady, náklady na vývoj metod, které jsou odvislé od konkrétní situace vybavenosti (materiální i personální) pracoviště. ~~Při~~ Pro případné využití služeb komerčních laboratoří je možné se obrátit například na společnosti SEQme s.r.o., Genomac výzkumný ústav, s.r.o., BIOCEV, které disponují potřebnou vybaveností.

VI. Dedikace

Metodika vznikla za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpora MZE-RO0118 a je výsledkem řešení výzkumného projektu NAZV č. QK1810129.

VII. Seznam použité související literatury

- BEHM A., KONNERT M. 2002. Proposal for a seed certification scheme. *Dendrobiology*, 47: 105–108.
- CVJETKOVIĆ B., KONNERT M., FUSSI B., MATARUGA M., ŠIJACIĆ-NIKOLIĆ M., DANIČIĆ V., LUČIĆ A. 2017. Norway spruce (*Picea abies* Karst.) variability in progeny tests in Bosnia and Herzegovina. *Genetika*, 49: 259–272.
- EARL D. A., HOLDT B. M. VON 2012. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4: 359–361.
- FALUSH D., STEPHENS M., PRITCHARD J. K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164(4): 1567–1587.
- FALUSH D., STEPHENS M., PRITCHARD J. K. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology*, 7(4): 574–578.
- FLUCH S., BURG A., KOPECKY D., HOMOLKA A., SPIESS N., VENDRAMIN G. G. 2011. Characterization of variable EST SSR markers for Norway spruce (*Picea abies* L.). *BMC Research Notes* 4: 401
- HUBISZ M. J., FALUSH D., STEPHENS M., PRITCHARD J. K. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, 9(5): 1322–1332.
- KONNERT M., BEHM A. 2006. Proof of identity of forest reproductive material based on reference samples. *Mitteilungen der Bundesforschungsanstalt der Forst- und Holzwirtschaft (BFH)*, 221: 61–71.
- KOTRLA P., PAŘÍZEK M. 2008. Kontroly dodavatelů RM prováděné ze strany ÚHÚL. *Lesnická práce*, 10: 26–27.

MELNIKOVA M. N., PETROV N. B., LOMOV A. A., LA PORTA N., POLITOV D. V. 2012. Testing of microsatellite primers with different populations of Eurasian spruces *Picea abies* (L.) Karst. and *Picea obovata* Ledeb. Russian Journal of Genetics, 48: 562–566.

MELONI M., PERINI D., BINELLI G. 2007. The distribution of genetic variation in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) populations in the western Alps. Journal of Biogeography, 34: 929–938.

NEI M. 1972. Genetic distance between populations. American Naturalist, 106: 283–392.

NOWAKOWSKA J. A., ZACHARA T., KONECKA A. 2014. Genetic variability of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) natural regeneration compared with their maternal stands. Leśne Prace Badawcze, 75 (1): 47-54.

PEAKALL R., SMOUSE P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes, 6: 288–295.

PEAKALL R., SMOUSE P.E. 2012. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. Bioinformatics, 28: 2537–2539.

PRITCHARD J. K., STEPHENS M., DONNELLY P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics, 155(2): 945–959.

RUNGIS D., BÉRUBÉ Y., ZHANG J., RALPH S., RITLAND C.E., ELLIS B.E., DOUGLAS C., BOHLMANN J., RITLAND K. 2004. Robust simple sequence repeat markers for spruce (*Picea* spp.) from expressed sequence tags. Theoretical and Applied Genetics, 109: 1283–1294.

SCOTTI I., MAGNI F., FINK R., POWELL W., BINELLI G., HEDLEY P.E. 2000. Microsatellite repeats are not randomly distributed within Norway spruce (*Picea abies* K.) expressed sequences. Genome, 43: 41–46.

SCOTTI I., MAGNI F., PAGLIA G. P., MORGANTE M. 2002. Trinucleotide microsatellites in Norway spruce (*Picea abies*): their features and the development of molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 40–50.

SCOTTI I., PAGILA G., MAGNI F., MORGANTE M. 2006. Population genetics of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) at regional scale: sensitivity of different microsatellite motif classes in detecting differentiation. *Annals of Forest Science*, 63:485-491.

ŠINDELÁŘ J. 2000. Možné důsledky porušování zákona o lesích a dalších normativních ustanovení při nakládání s reprodukčním materiálem lesních dřevin. *Zprávy lesnického výzkumu*, 3: 37–41.

TOLLEFSRUD M. M., SØNSTEBØ J. H., BROCHMANN C., JOHNSEN Ø., SKROPPA T., VENDRAMIN G. G. 2009. Combined analysis of nuclear and mitochondrial markers provide new insight into the genetic structure of North European *Picea abies*. *Heredity*, 102: 549–562.

UNGER G. M., KONRAD H., GEBUREK T. 2011. Does spatial genetic structure increase with altitude? An answer from *Picea abies* in Tyrol, Austria. *Plant Systematics and Evolution* 292: 133–141.

VERBYLAITĖ R., PLIŪRA A., LYGIS V., SUCHOCKAS V., JANKAUSKIENĖ J., LABOKAS J. 2017. Genetic diversity and its spatial distribution in self-regenerating Norway spruce and Scots pine stands. *Forests*, 8: 470; doi:10.3390/f8120470.

VIII. Seznam publikací, které předcházejí metodice

CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., DOSTÁL J., MALÁ J.. Sledování genetické proměnlivosti chlumního ekotypu smrku ztepilého pomocí RAPD. (Studying of genetic variability of Norway spruce hurst ecotype by RAPD). Zprávy lesnického výzkumu, 56, 2011(2): 137–143.

CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., DOSTÁL J., MALÁ J.. Hodnocení genetické diversity vybraných populací smrku ztepilého pomocí mikrosatelitových markerů. (Assessment of genetic diversity of selected populations of Norway spruce by microsatellite markers). Zprávy lesnického výzkumu, 58, 2013 (3): 248–252.

MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., MALÁ J. Využití mikrosatelitových markerů pro hodnocení semenného sadu smrku ztepilého (Evaluation of Norway spruce seed orchard using microsatellite markers). Zprávy lesnického výzkumu, 59, 2014 (4): 243–249.

MALÁ J., CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., KONNERT M.. Možnosti kontroly identity reprodukčního materiálu lesních dřevin využívaného při umělé obnově lesa a zalesňování pomocí analýz DNA: odborné sdělení. Zprávy lesnického výzkumu, 58, 2013(4): 388–390.

CVRČKOVÁ H., MÁCHOVÁ P., TRČKOVÁ O. Využití mikrosatelitových markerů pro hodnocení genetické diversity smrku ztepilého. Genetická charakterizace smrku ztepilého pomocí mikrosatelitových markerů. Lesnický průvodce, 2018, 6: 35 s.

MÁCHOVÁ P., TRČKOVÁ O., CVRČKOVÁ H. Use of nuclear microsatellite loci for evaluating genetic diversity of selected populations of *Picea abies* (L.) Karsten in the Czech Republic. Forests 2018, 9, 92: 1–15; doi:10.3390/f9020092.

MÁCHOVÁ P., CVRČKOVÁ H., TRČKOVÁ O. Využití DNA markerů pro kontrolu deklarovaného původu reprodukčního materiálu smrku ztepilého (Using DNA analyzes for verifying the declared origin of Norway spruce reproductive material). Zprávy lesnického výzkumu 69, 2021 (4), v tisku.

Methodology of using DNA markers for the system of control of declared origin of reproductive material of Norway spruce

Summary

Identity of forest tree reproductive material is essential in artificial forest regeneration. A certain proof of origin is important for tracing back forest reproductive material. The Czech Republic as a member state of the European Union and on the base of international legislation (Council Directive 1999/105/EC on the marketing of forest reproductive material on the market) has the obligation to create a functioning control system for determination of forest reproductive material. Its aim is to ensure clear identification of reproductive material from the acquisition to delivery to the consumer. The Directive 1999/105/EC is transposed into national legislation by Act No. 149/2003 Coll., on the marketing of forest reproductive material of forestry importance and artificial hybrids, intended for forest regeneration and afforestation, and amending certain related acts (Act on Trade in reproductive material of forest trees), as amended, the provisions of which include appropriate adjustment control measures. The existing legal regulations on forest reproductive material in the Czech Republic provide only the inspection of the master certificates and delivery papers as a control measure. The aim of this methodology is to present the possibilities of using objective methods of DNA analysis to verify the declared origin of reproductive material of Norway spruce in terms of the Czech Republic. The methodology describes the processes of sampling, isolation of DNA, conditions of the polymerase chain reaction (PCR), separation and sizing of amplification products, and molecular data calculations. The methodological procedures based on a study of monitoring of the identity of reproductive material were realized during three years, i.e. from seed collection to transplanted plants production. DNA analyses were performed on 1920 samples of plant material from 8 selected sources of reproductive material. Sampling of reference samples was realized from the sets and units of reproductive material listed in Table 2. Seed collections for units of reproductive material took place from 35 – 60 trees from 8 recognized stands. From each of 8 reproductive material units 60 samples were analysed from raw cones seeds, 60 samples from seeds after extraction and cleaning, 60 samples from seedling production and 60 samples from transplanted plants. Total genomic DNA was extracted using a DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands). The SSR method is based on the polymerase chain reaction (PCR) with specific primers. Seven optimally polymorphic markers (PAAC23, SpAG2, WS00111.K13, WS00716.F13, WS0022.B15, WS0073.H08, WS0023.B03) with sufficient informative value were selected for the subsequent evaluation of the genetic structure of the monitored sets of Norway spruce reproductive material by Bayesian

clustering. PCR and fragment analysis procedures were optimized for selected markers. PCR products were separated by capillary electrophoresis using the Applied Biosystems 3500 genetic analyser. The statistical programs GenAIEx 6.503 (PEAKALL, SMOUSE 2006, 2012) and the Bayesian clustering method implemented in the software STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD et al. 2000; FALUSH et al. 2003, 2007; HUBISZ et al. 2009) were used to analyse the genetic data. The genetic diversity parameters with the primer sequences of the studied markers are reported in **Table 1**. Nei's genetic distances among Norway spruce sample sets, constructed on the basis of principal coordinate analysis (PCoA), are graphically illustrated in **Figs. 1 – 4**. The structuring of investigated Norway spruce sample sets was also confirmed by various proportions of genetic profiles according to the Bayesian clustering method results (**Fig. 5 – 8**). Using the performed Structure analysis, the obtained profiles of 8 monitored units of reproductive material (4 sample sets from one units) of different origin were distinguishable from each other. According to the performed evaluations of sets with different sample numbers (60, 30, 20, 10) in the compared sets, it can be declared that the recommended number of samples to confirm agreement in population structures is 60 (**Fig. 1, 5**). Based on a high statistical significance of the results obtained this sample number enables to make qualified decisions on identity/ verifying of declared origin of Norway spruce reproductive material. Thus, these methodological procedures could be used in state control systems of forest reproductive material origin and to increase consumer protection of forest owners and nursery producers in the Czech Republic.

Příloha

Příklady výstupů genetických analýz pro nastavení systému kontroly deklarovaného původu reprodukčního materiálu u smrku ztepilého

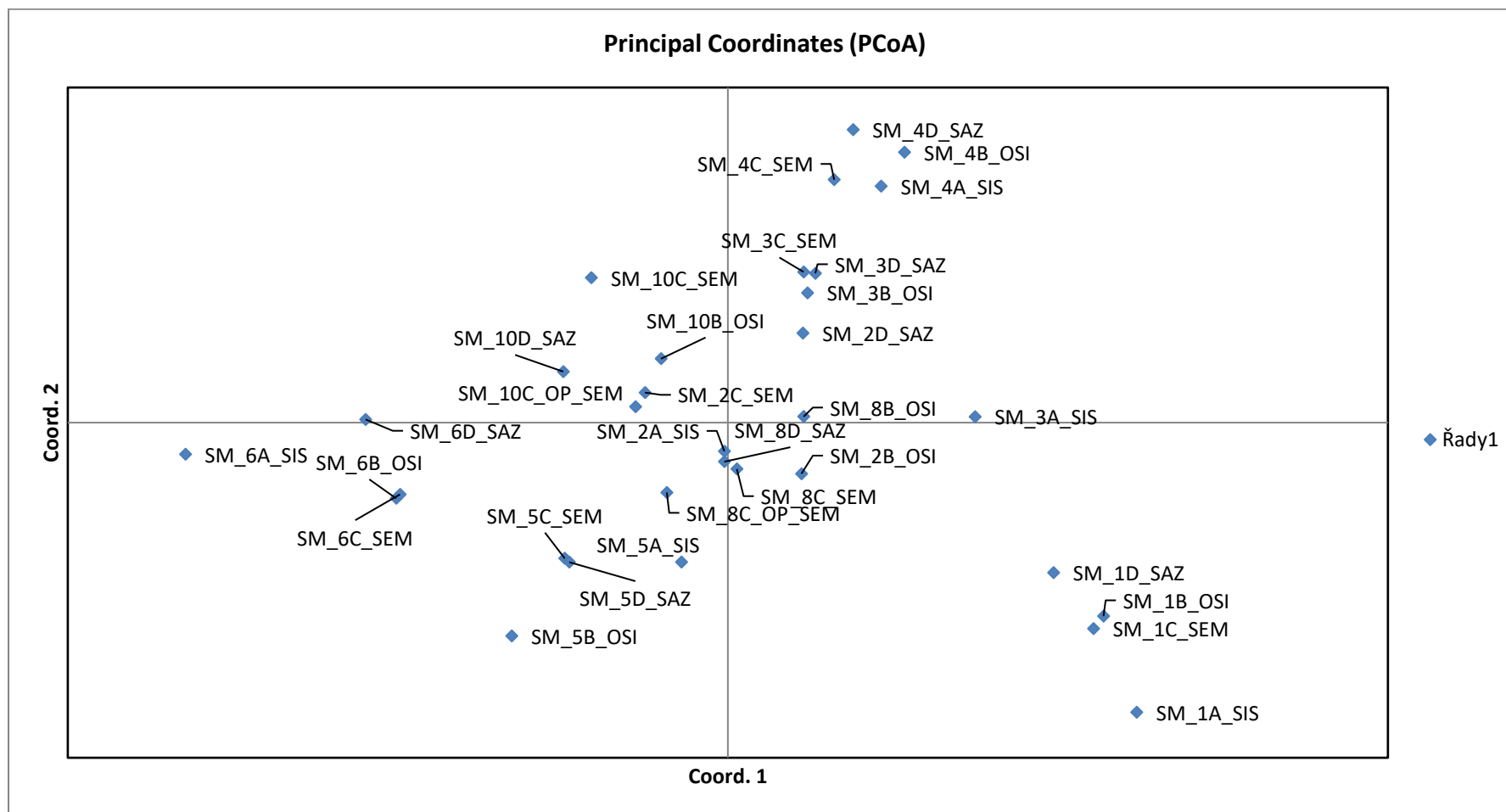
Tab. 2. Přehled oddílů reprodukčního materiálu a označení jednotlivých analyzovaných souborů vzorků smrku ztepilého / Overview of forest reproductive material sources and designation of Norway spruce sample sets

Označení oddílu / designation of forest reproductive material source	Původ / Proof				fáze odběru vzorku / sampling phase	označení souboru vzorků / designation of sample set
	ČUJ / source of forest reproductive material	rok zrání / maturation year	Přírodní lesní oblast / Natural Forest Areas	Lesní vegetační stupeň / Forest vegetation zone		
1	CZ-2-2A-SM-0004-36-3-Z	2017	3. LVS	36 - Středomoravské Karpaty	vzorek ze šišek po sběru	SM_1A_SIS
					vzorek z osiva po vylučování	SM_1B_OSI
					vzorek ze semenáčků ve školce	SM_1C_SEM
					vzorek ze školovaných sazenic ve školce	SM_1D_SAZ
2	CZ-2-2A-SM-00010-17-3-E	2017	3. LVS	17 - Polabí	vzorek ze šišek po sběru	SM_2A_SIS
					vzorek z osiva po vylučování	SM_2B_OSI
					vzorek ze semenáčků ve školce	SM_2C_SEM
					vzorek ze školovaných sazenic ve školce	SM_2D_SAZ
3	CZ-2-2A-SM-00002-8-3-S	2017	3. LVS	8 - Křivoklátsko	vzorek ze šišek po sběru	SM_3A_SIS
					vzorek z osiva po vylučování	SM_3B_OSI
					vzorek ze semenáčků ve školce	SM_3C_SEM
					vzorek ze školovaných sazenic ve školce	SM_3D_SAZ
4	CZ-2-2A-SM-03411-38-5-Z	2017	5. LVS	38 - Bílé Karpaty a Vizovické vrchy	vzorek ze šišek po sběru	SM_4A_SIS
					vzorek z osiva po vylučování	SM_4B_OSI

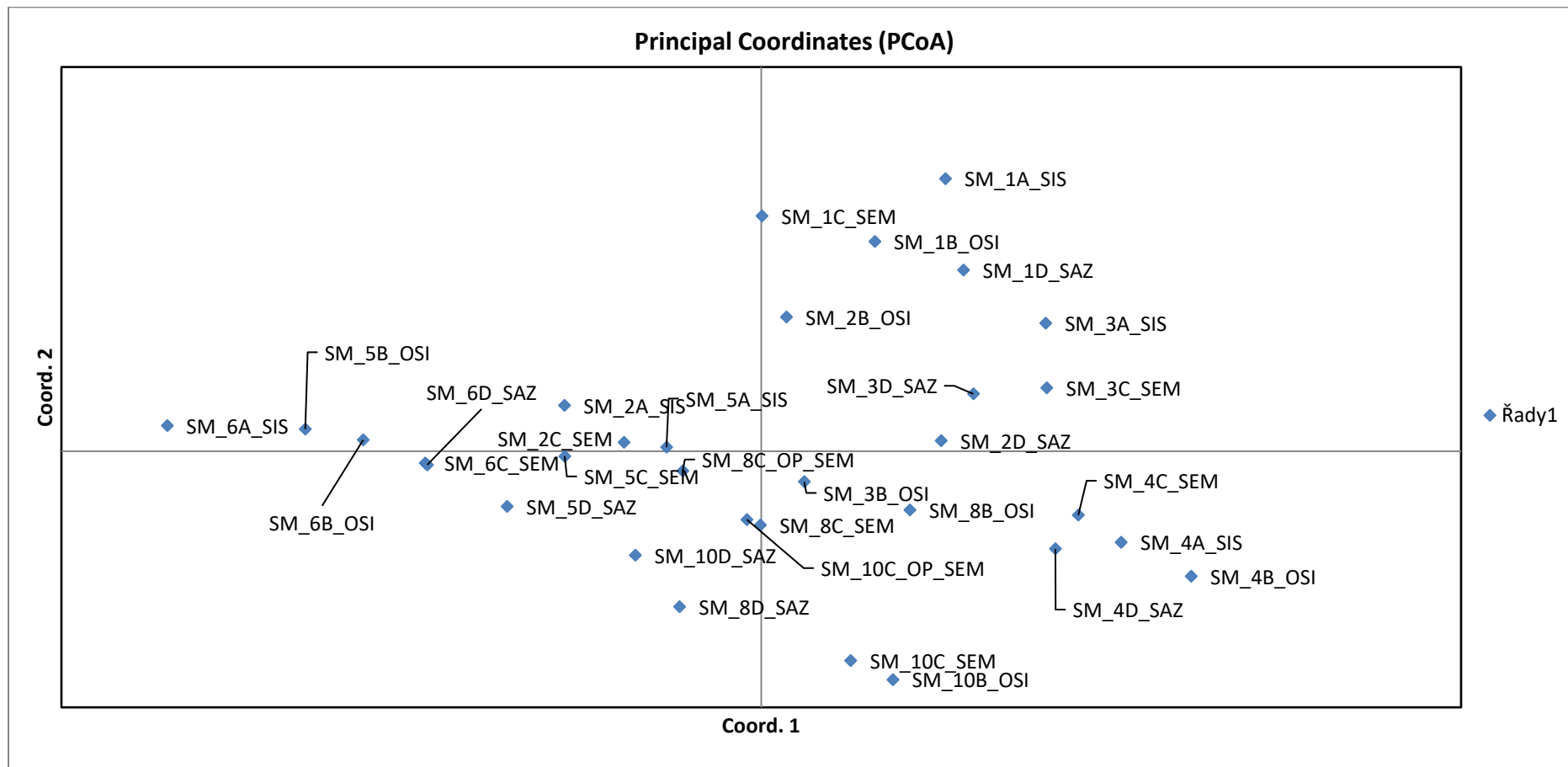
					vzorek ze semenáčků ve školce	SM_4C_SEM
					vzorek ze školkových sazenic ve školce	SM_4D_SAZ
5	CZ-2-2A-SM-03546-31-4-E	2017	4.LVS	31 - Českomoravské mezihorí	vzorek ze šišek po sběru	SM_5A_SIS
					vzorek z osiva po vylúštění	SM_5B_OSI
					vzorek ze semenáčků ve školce	SM_5C_SEM
					vzorek ze školkových sazenic ve školce	SM_5D_SAZ
6	CZ-2-2A-SM-03379-40-5-T-G185	2017	5. LVS	40 - Moravskoslezské Beskydy	vzorek ze šišek po sběru	SM_6A_SIS
					vzorek z osiva po vylúštění	SM_6B_OSI
					vzorek ze semenáčků ve školce	SM_6C_SEM
					vzorek ze školkových sazenic ve školce	SM_6D_SAZ
8	B-SM-56+4-25-6-RK	1995	6. LVS	25 - Orlické hory	vzorek z osiva po vylúštění	SM_8B_OSI
					vzorek ze semenáčků ve školce	SM_8C_SEM
					vzorek ze semenáčků ve školce 2 varianta	SM_8C_OPO_SEM
					vzorek ze školkových sazenic ve školce	SM_8D_SAZ
10	CZ-2-2A-SM-3134-25-7-H	2006	7. LVS	25 - Orlické hory	vzorek z osiva po vylúštění	SM_10B_OSI
					vzorek ze semenáčků ve školce	SM_10C_SEM
					vzorek ze semenáčků ve školce 2 varianta	SM_10C_OPO_SEM
					vzorek ze školkových sazenic ve školce	SM_10D_SAZ

* Oddíly označené 7 a 9 nebyly do vyhodnocovací analýzy zařazeny z důvodu nedostatečné velikosti souborů dat

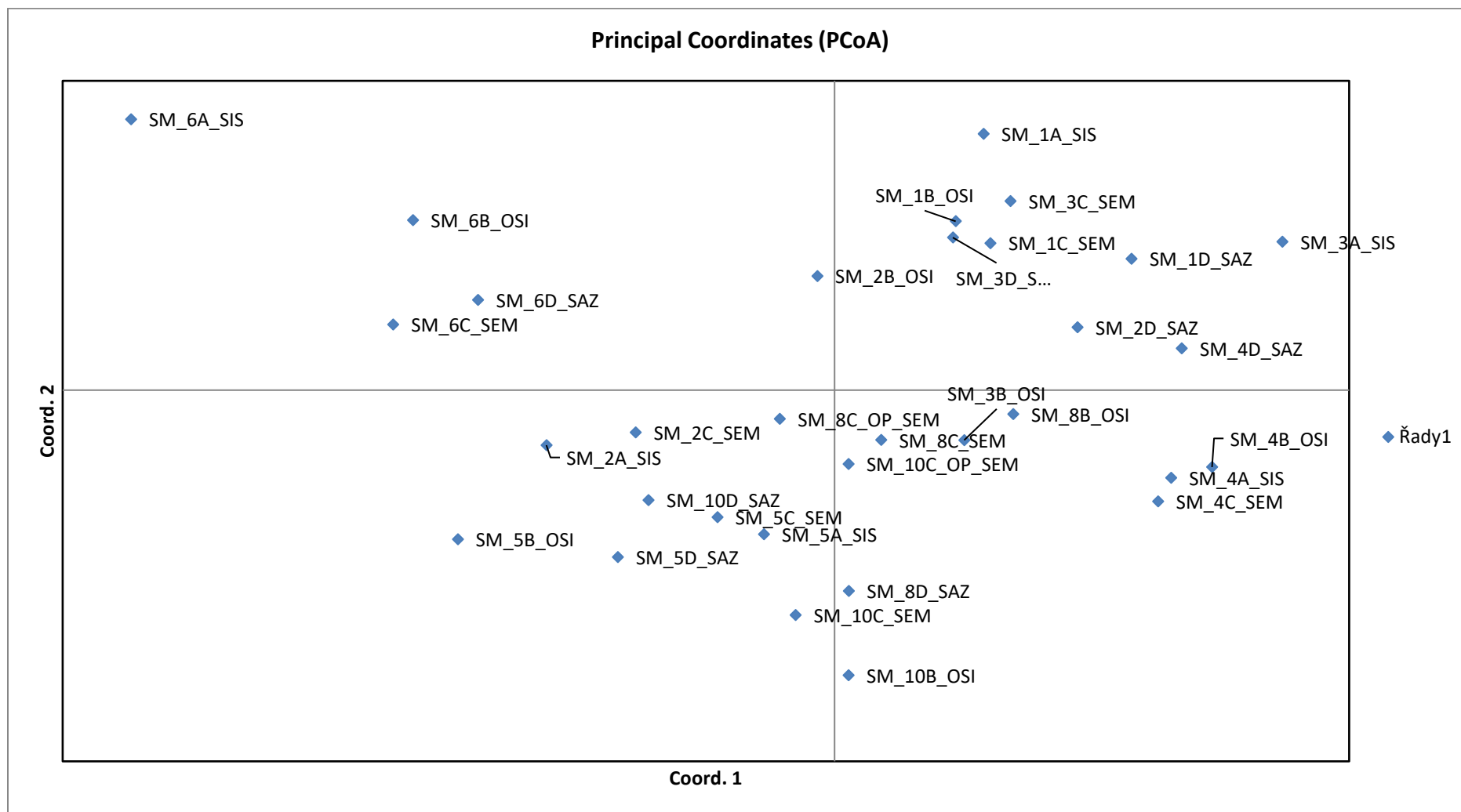
Obr. 1. Výsledky analýzy hlavních koordinát (PCoA) při použití 60 vzorků ve sledovaných souborech/ **Fig. 1.** Results of the principal coordinate analysis (60 samples in observed sets)



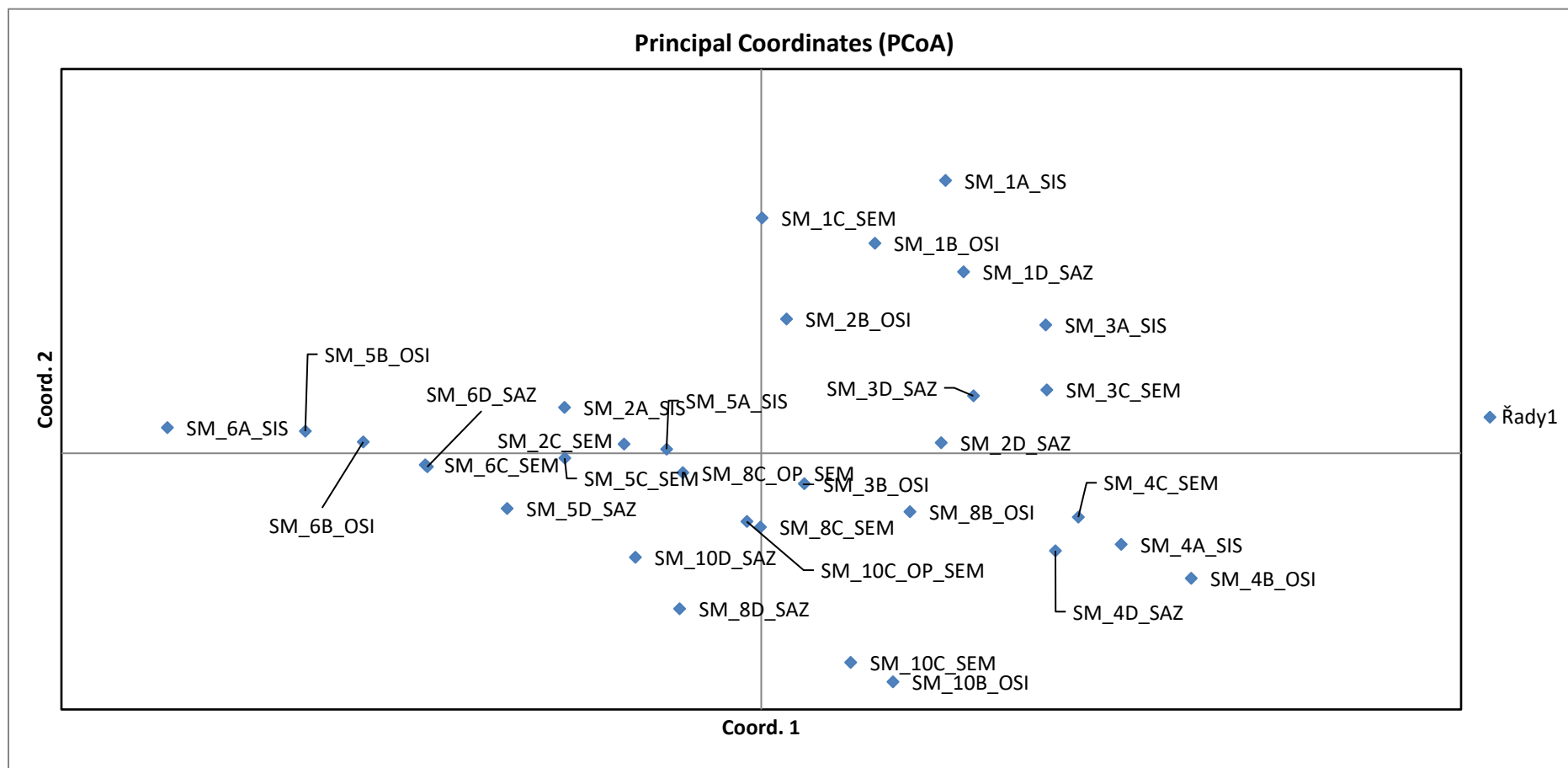
Obr. 2. Výsledky analýzy hlavních koordinát (PCoA) při použití 30 vzorků ve sledovaných souborech/ **Fig. 2.** Results of the principal coordinate analysis (30 samples in observed sets)



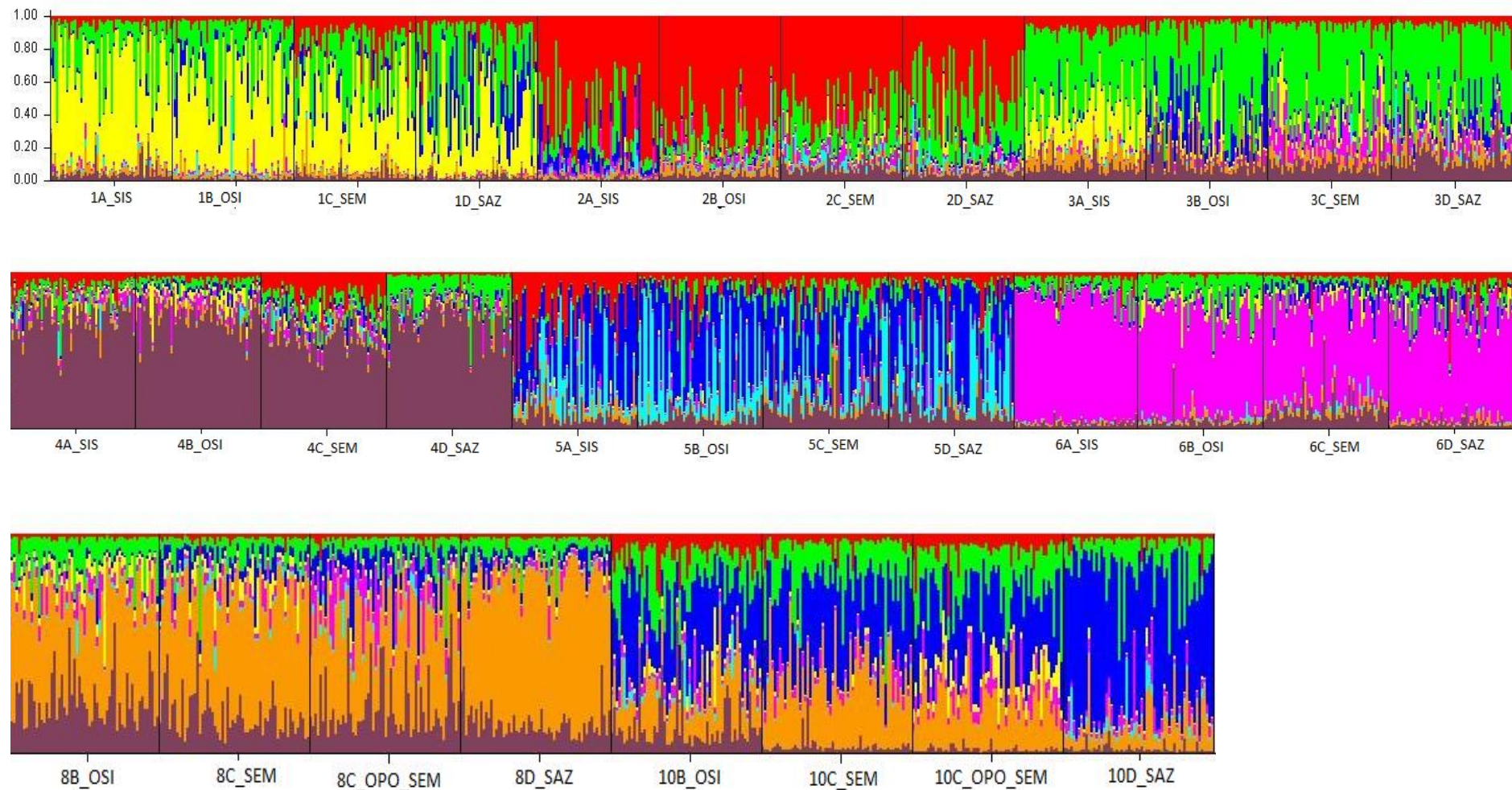
Obr. 3. Výsledky analýzy hlavních koordinát (PCoA) při použití 20 vzorků ve sledovaných souborech/ **Fig. 3.** Results of the principal coordinate analysis (20 samples in observed sets)



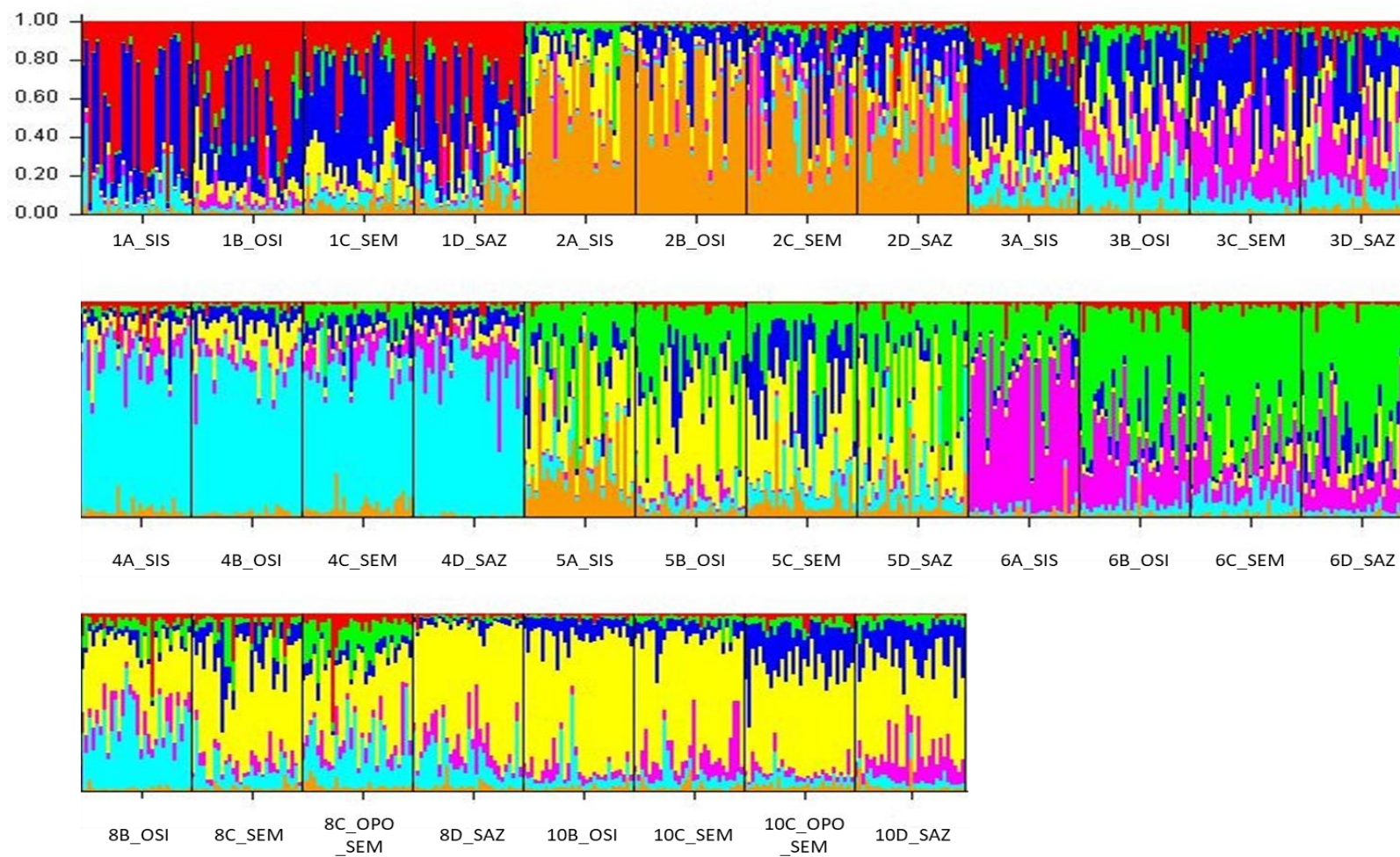
Obr. 4. Výsledky analýzy hlavních koordinát (PCoA) při použití 10 vzorků ve sledovaných souborech/ **Fig. 4.** Results of the principal coordinate analysis (10 samples in observed



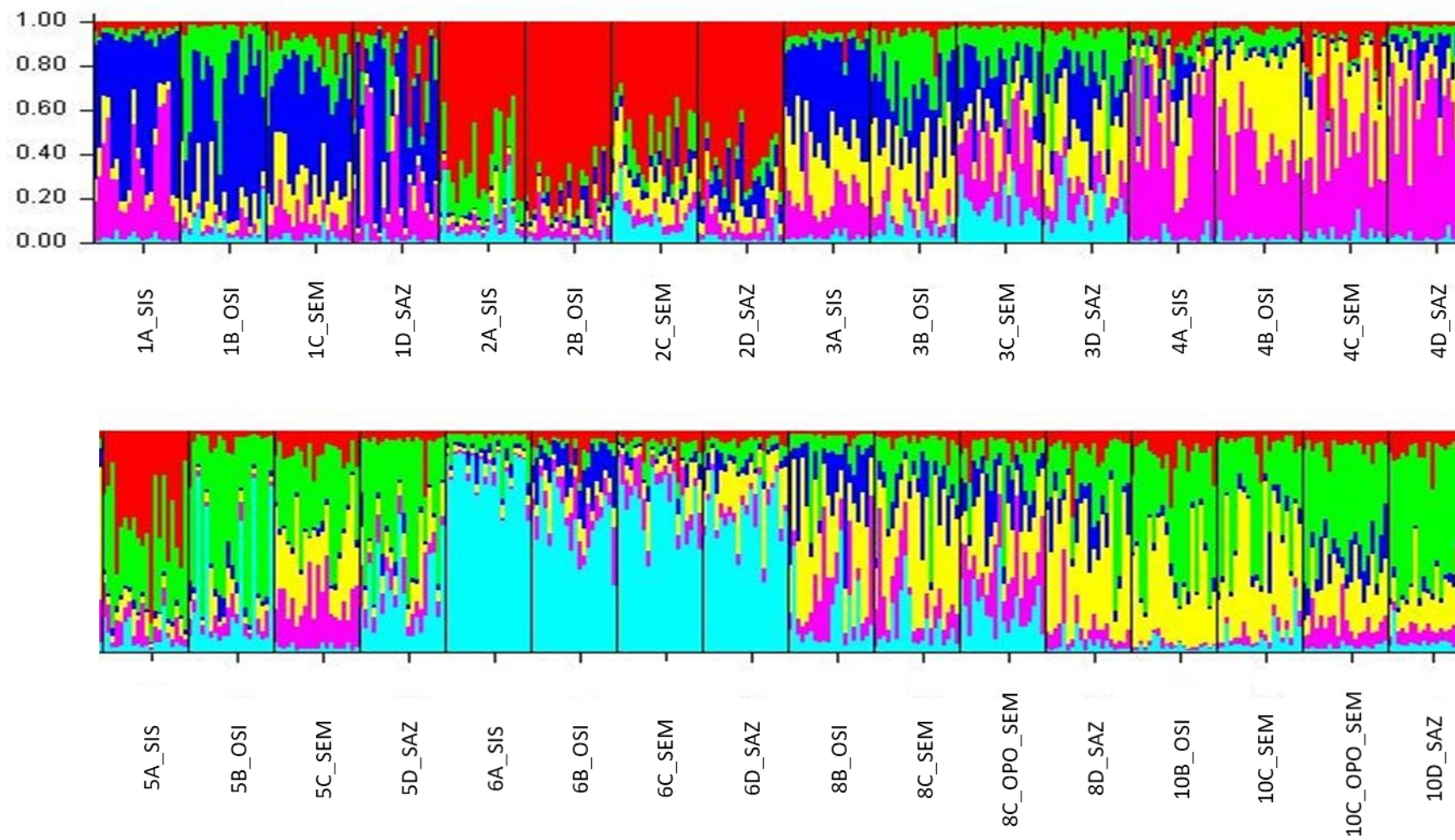
Obr. 5. Zhodnocení genetické struktury Bayesianskou metodou pro $K = 8$ u 32 sledovaných souborů vzorků (60) z 8 různých zdrojů RM/ **Fig. 5.** Evaluation of genetic structure by Bayesian method for $K = 8$ in 32 observed sets of 60 samples from 8 different sources RM



Obr. 6. Zhodnocení genetické struktury Bayesianou metodou pro $K = 8$ u 32 sledovaných souborů vzorků (30) z 8 různých zdrojů RM / **Fig. 6.** Evaluation of genetic structure by Bayesian method for $K = 8$ in 32 observed sets of 30 samples from 8 different sources RM



Obr. 7. Zhodnocení genetické struktury Bayesiánskou metodou pro $K = 8$ u 32 sledovaných souborů vzorků (20) z 8 různých zdrojů RM / **Fig. 7.** Evaluation of genetic structure by Bayesian method for $K = 8$ in 32 observed sets of 20 samples from 8 different sources RM



Obr. 8. Zhodnocení genetické struktury Bayesianou metodou pro $K = 8$ u 32 sledovaných souborů vzorků (10) z 8 různých zdrojů RM / **Fig. 8.** Evaluation of genetic structure by Bayesian method for $K = 8$ in 32 observed sets of 10 samples from 8 different sources RM

